

10/501671

PCT/JPC3/00339

10 Rec'd PCT/PTC 16 J 0004  
日本国特許庁

17.01.03

JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 1月18日

REC'D 14 MAR 2003

出願番号

Application Number:

特願2002-009951

[ST.10/C]:

[JP2002-009951]

WIPO

PCT

出願人

Applicant(s):

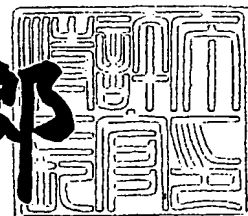
旭化成株式会社

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 2月25日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2003-3010150

【書類名】 特許願

【整理番号】 X13-1568

【あて先】 特許庁長官 及川 耕造 殿

【国際特許分類】 A61K 38/14

【発明者】

    【住所又は居所】 静岡県田方郡大仁町三福 6 3 2 番地の 1

    【氏名】 西尾 文秀

【特許出願人】

    【識別番号】 000000033

    【氏名又は名称】 旭化成株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100090941

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 藤野 清也

【選任した代理人】

    【識別番号】 100113837

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 吉見 京子

【選任した代理人】

    【識別番号】 100076244

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 藤野 清規

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 014834

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 有効成分として可溶性トロンボモジュリンを10mg以上含有する可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤であって、(1) グルタミン酸またはその塩、およびマンニトールの2種を含む、(2) グルタミン酸またはその塩、およびリシンまたはその塩の2種を含む、(3) グルタミン酸またはその塩、およびアスパラギン酸またはその塩の2種を含む、または(4) アスパラギン酸またはその塩、およびマンニトールの2種を含む、のいずれかの組み合わせを含有せしめ、且つ該製剤が、0.1mL から2mL の水に溶解し得るものであって、その溶解時の浸透圧比が 0.5から2.0 であることを特徴とする可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤。

【請求項2】 有効成分として可溶性トロンボモジュリンを15mg以上含有する可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤であって、グルタミン酸またはその塩、およびマンニトールを含有することを特徴とする請求項1に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤。

【請求項3】 有効成分として可溶性トロンボモジュリンを15mg以上含有する可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤であって、グルタミン酸またはその塩、およびリシンまたはその塩を含有することを特徴とする請求項1に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤。

【請求項4】 有効成分として可溶性トロンボモジュリンを15mg以上含有する可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤であって、グルタミン酸またはその塩、およびアスパラギン酸またはその塩を含有することを特徴とする請求項1に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤。

【請求項5】 有効成分として可溶性トロンボモジュリンを15mg以上含有する可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤であって、アスパラギン酸またはその塩、およびマンニトールを含有することを特徴とする請求項1に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤。

【請求項6】 グルタミン酸またはその塩が、グルタミン酸ナトリウムであ

る請求項 1 から 4 のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤

【請求項 7】 リシンまたはその塩が、リシン塩酸塩である請求項 1 または 3 に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤。

【請求項 8】 アスパラギン酸またはその塩が、アスパラギン酸ナトリウムである請求項 1、4 及び 5 のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤。

【請求項 9】 グルタミン酸またはその塩が、グルタミン酸ナトリウムであり、リシンまたはその塩がリシン塩酸塩である請求項 1 または 3 に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤。

【請求項 10】 グルタミン酸またはその塩、およびリシンまたはその塩の 2 種を含む組み合わせが、リシングルタミン酸塩である請求項 1 または 3 に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤。

【請求項 11】 グルタミン酸またはその塩がグルタミン酸ナトリウムであり、アスパラギン酸またはその塩がアスパラギン酸ナトリウムである請求項 1 または 4 に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤。

【請求項 12】 可溶性トロンボモジュリンが、水に少なくとも 30mg/mL の濃度として溶解可能なペプチドであることを特徴とする請求項 1 から 11 のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤。

【請求項 13】 可溶性トロンボモジュリンが、以下の配列の 1 つを含有するペプチドであり、トロンビンのプロテイン C の活性化を促進する作用を有し、且つ界面活性剤の非存在下で溶解し得るものであることを特徴とする請求項 1 から 12 のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤。

- i) 配列表配列番号 3 の 19-132 のアミノ酸配列。
- ii) 配列表配列番号 7 の 19-132 のアミノ酸配列。
- iii) 上記 i)、または ii) のアミノ酸配列に、少なくとも 1 つ以上のアミノ酸の付加、欠失、または置換されたアミノ酸配列。

【請求項 14】 可溶性トロンボモジュリンが、配列表配列番号 4 または 8 の 55-396 の塩基配列の相補 DNA に対してストリンジェントな条件下にてハイブリ

ダイズできる DNAによりコードされ得るペプチドであり、トロンビンのプロテインCの活性化を促進する作用を有し、且つ界面活性剤の非存在下で溶解し得ることのできることを特徴とする請求項1から13のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤。

【請求項15】 可溶性トロンボモジュリンが、以下の配列の1つを含有するペプチドであり、トロンビンのプロテインCの活性化を促進する作用を有し、且つ界面活性剤の非存在下で溶解し得るものであることを特徴とする請求項1から13のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤。

- i) 配列表配列番号1の19-516のアミノ酸配列。
- ii) 配列表配列番号5の19-516のアミノ酸配列。
- iii) 上記i)、またはii)のアミノ酸配列に、少なくとも1つ以上のアミノ酸の付加、欠失、または置換されたアミノ酸配列。

【請求項16】 凍結乾燥製剤であることを特徴とする請求項1から15のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤。

【請求項17】 可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤が、皮下または筋肉内注射用の製剤であることを特徴とする請求項1から16のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤。

【請求項18】 請求項1から17のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤と、その製剤の溶解のための水とが組み合わされ、且つその水の容量が0.1mLから2mLであることを特徴とするキット製剤。

【請求項19】 有効成分として可溶性トロンボモジュリンを10mg以上含有する可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤における可溶性トロンボモジュリンの安定化方法であって、(1) グルタミン酸またはその塩、およびマンニトールの2種を含む、(2) グルタミン酸またはその塩、およびリシンまたはその塩の2種を含む、(3) グルタミン酸またはその塩、およびアスパラギン酸またはその塩の2種を含む、または(4) アスパラギン酸またはその塩、およびマンニトールの2種を含む、のいずれかの組み合わせを含有せしめ、且つ該製剤が、0.1mL から2mLの水に溶解し得るものであって、その溶解時の浸透圧比が0.5から2.0であることを特徴とする、可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤における可溶性

トロンボモジュリンの安定化方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、高濃度の可溶性トロンボモジュリンを含有する製剤、および該製剤中の可溶性トロンボモジュリンの安定化方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

トロンボモジュリンは、トロンピンと特異的に結合し、トロンピンによるプロテインCの活性化を著しく促進する作用を有する物質である。プロテインCは、血液凝固線溶系において重要な役割を演じているビタミンK依存性の蛋白質であり、トロンピンの作用により活性化され、活性型プロテインCとなる。この活性型プロテインCは、生体内で血液凝固系因子の活性型第V因子、および活性型第VIII因子を失活させ、また血栓溶解作用を有するプラスミノーゲンアクチベーターの産生に関与していることが知られている [鈴木宏治、医学のあゆみ、第125巻、901頁(1983年)]。

【0003】

したがって、トロンボモジュリンは、このトロンピンによるプロテインCの活性化を促進して抗血液凝固剤又は血栓溶解剤として有用であるとされている。また、従来トロンボモジュリンの用途としては、例えば、急性冠動脈症候群(ACS)、血栓症、末梢血管閉塞症、閉塞性動脈硬化症、血管炎、心臓手術に続発する機能性障害、臓器移植の合併症、血管内血液凝固症候群(DIC)、狭心症、一過性脳虚血発作、妊娠中毒症、糖尿病、肝VOD、深部静脈血栓症(DVT)等の疾患の治療および予防に用いられることが期待されている。

【0004】

従来、トロンボモジュリンは、ヒトをはじめとする種々の動物種の血管内皮細胞上に発現している糖蛋白質として発見取得され、その後、クローニングに成功した。即ち、遺伝子工学的手法を用いてヒト肺cDNAライブラリーからシグナルペプチドを含むヒトトロンボモジュリン前駆体の遺伝子をクローニングし、そして

トロンボモジュリンの全遺伝子配列を解析し、18アミノ酸残基のシグナルペプチドを含む 575残基のアミノ酸配列が明らかにされている（特開昭64-6219号公報）。シグナルペプチドが切断されたマチュアなトロンボモジュリンは、そのマチュアなペプチドのN末端側よりN末端領域(1-226番目)、6つのEGF様構造をもつ領域(227-462番目)、O型糖鎖付加領域(463-498番目)、膜貫通領域(499-521番目)、そして細胞質内領域(522-557番目)の5つの領域から構成されており、そして全長のトロンボモジュリンと同じ活性を有する部分としては、6つのEGF様構造を持つ領域のうち、主にはN末端側から4, 5, 6番目のEGF様構造からなる部分であることが知られている [M. Zushiら、J. Biol. Chem., 246, 10351-10353(1989)]。

少なくとも、膜貫通領域を含有しないように調製された可溶性トロンボモジュリンにおいては、界面活性剤の非存在下でもきれいに溶解することができ、例えば、N末端領域と6つのEGF様構造をもつ領域とO型糖鎖付加領域の3つの領域のみからなる（即ち、配列番号1の19～516位のアミノ酸配列からなる）可溶性トロンボモジュリンは、組換え技術の応用により取得できること、そしてその組換え体可溶性トロンボモジュリンは、天然のトロンボモジュリンの活性を有していることが確認されている（特開昭 64-6219号公報）。他に可溶性トロンボモジュリンの例として、特開平2-255699号公報、特開平3-133380号公報、特開平3-259084号公報、特開平4-210700号公報、特開平5-213998号公報、W092/00325号公報、W092/03149号公報、W093/15755号公報等に記載の可溶性トロンボモジュリンが挙げられる。あるいは天然型としてヒト尿由来の可溶性トロンボモジュリン（特開平 3-86900号公報、特開平3-218399号公報）等も例示される。

#### 【 0 0 0 5 】

因みに、遺伝子においては、自然の変異または取得時の変異により、多くのケースで認められる通り、ヒトにおいても多形性の変異が見つけられており、上述の 575残基のアミノ酸配列からなるヒトトロンボモジュリン前駆体の第 473位のアミノ酸において Valであるものと、Ala であるものが現在確認されている。このアミノ酸をコードする塩基配列においては、第1418位において、それぞれTとCとの変異に相当する [Wen ら、Biochemistry, 26, 4350-4357(1987)]。しかし

、活性および物性においては、全く相違なく、両者は実質的に同一と判断できる。

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

これらの可溶性トロンボモジュリンを医薬組成物として使用する際には、各種の治療対象疾患や各種の投与方法が知られている。たとえば、W099/18994において、水溶液注射剤の開示があり、静脈等の血管内投与の他、筋肉内投与や皮下投与方法の投与方法が知られている。これらの全ての治療対象疾患や投与方法に適合する製剤の開発が待たれていた。

#### 【0007】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために可溶性トロンボモジュリン高濃度製剤を作成することとし、従来の技術を検討したが、単純に従来公知の製剤組成を適用することはできないことが確認された。すなわち、各種の治療対象疾患や各種の投与方法に広く適用可能な可溶性トロンボモジュリンの高濃度製剤の調製においては、例えば特に筋肉内投与や皮下投与方法の投与方法に採用できるためには、筋肉内や皮下に対して一定量以上の溶液量を投与することは困難である点が挙げられる。しかも、本発明者らが子細に検討したところ、該投与溶液の浸透圧が低すぎても高過ぎても疼痛が強く現れ好ましくないことが確認された。

#### 【0008】

一方、トロンボモジュリンを医薬組成物として広く安定的に供給するに際しては凍結乾燥製剤とすることが知られているが、この凍結乾燥の過程で、可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を凍結乾燥すると、変性または会合等によって高分子化した多量体が生成することが明らかとなっている。従来、可溶性トロンボモジュリンの変性を防止する方法として、アミノ酸またはその塩類および糖類よりなる群から選ばれた一種または二種以上を添加することが知られている（特開平6-321805号公報）。しかしながら、同公報が具体的に開示する添加物やその添加量による組成物は、疼痛等の点において必ずしも好ましくないことが、本発明者らにより確認された。すなわち、特開平6-321805号公報の開示する具体的な



組成物（例えば実施例20）は、可溶性トロンボモジュリンを10mg以上含有する可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤とし、皮下や筋肉内投与を念頭において0.1mL から2mL の水に溶解した場合、本発明者らの実験によれば疼痛を示すことが確認された。

また、可溶性トロンボモジュリンに、マルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンを追加することにも知られているが（W095/16460号公報）、このW095/16460号公報中では、マンニトールの添加は可溶性トロンボモジュリンの変性を防止することはできないと記載されているため、当業者には必ずしも好ましい添加物とも考えられていない状況であったが、本件発明者らが鋭意検討したところ、例えば

W095/16460号公報中好ましくないと言われているマンニトールであっても、マンニトールにグルタミン酸またはその塩を共存させると、マンニトールを単独で添加するのに比べて、極めて高い安定性が達成されという顕著な相乗効果が認められ、浸透圧比を適当に調整できる濃度においても好ましい安定性が達成されるという事実を確認し、併せて、皮下や筋肉内投与をした場合でも疼痛が生じがたい製剤となることを確認して、本件発明を完成するに至った。

#### 【0009】

すなわち、本発明は、有効成分として可溶性トロンボモジュリンを10mg以上含有する可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤（場合によっては、可溶性トロンボモジュリン高含有製剤を意味する。以下同じ）であって、(1) グルタミン酸またはその塩、およびマンニトールの2種を含む、(2) グルタミン酸またはその塩、およびリシンまたはその塩の2種を含む、(3) グルタミン酸またはその塩、およびアスパラギン酸またはその塩の2種を含む、または(4) アスパラギン酸またはその塩、およびマンニトールの2種を含む、のいずれかの組み合わせを含有せしめ、且つ該製剤が、0.1mL から2mL の水に溶解し得るものであって、その溶解時の浸透圧比が 0.5から2.0 であることを特徴とする可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤である。

#### 【0010】

また本発明は、有効成分として可溶性トロンボモジュリンを15mg以上含有する可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤であって、グルタミン酸またはその塩

、およびマンニトールを含有せしめ、且つ該製剤が、0.1mL から2mL の水に溶解し得るものであって、その溶解時の浸透圧比が 0.5から2.0 であることを特徴とする可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤である。 また本発明は、有効成分として可溶性トロンボモジュリンを15mg以上含有する可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤であって、グルタミン酸またはその塩、および、リシンまたはその塩を含有せしめ、且つ該製剤が、0.1mL から2mL の水に溶解し得るものであって、その溶解時の浸透圧比が 0.5から2.0 であることを特徴とする可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤である。

## 【0011】

また本発明は、有効成分として可溶性トロンボモジュリンを15mg以上含有する可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤であって、グルタミン酸またはその塩、およびアスパラギン酸またはその塩を含有せしめ、且つ該製剤が、0.1mL から2mL の水に溶解し得るものであって、その溶解時の浸透圧比が 0.5から2.0 であることを特徴とする可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤である。

## 【0012】

また本発明は、有効成分として可溶性トロンボモジュリンを15mg以上含有する可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤であって、アスパラギン酸またはその塩、およびマンニトールを含有せしめ、且つ該製剤が、0.1mL から2mL の水に溶解し得るものであって、その溶解時の浸透圧比が 0.5から2.0 であることを特徴とする可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤である。

## 【0013】

さらに本発明は、有効成分として可溶性トロンボモジュリンを10mg以上含有する可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤における可溶性トロンボモジュリンの安定化方法であって、(1) グルタミン酸またはその塩、およびマンニトールの2種を含む、(2) グルタミン酸またはその塩、およびリシンまたはその塩の2種を含む、(3) グルタミン酸またはその塩、およびアスパラギン酸またはその塩の2種を含む、または(4) アスパラギン酸またはその塩、およびマンニトールの2種を含む、のいずれかの組み合わせを含有せしめ、且つ該製剤が、0.1mL から2mL の水に溶解し得るものであって、その溶解時の浸透圧比が 0.5から2.0 である

ことを特徴とする該安定化方法である。

【0014】

【発明の実施の形態】

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明で可溶性トロンボモジュリンとは、トロンビンに結合し、トロンビンによるプロテインCの活性化を促進する作用を有する物質であり、界面活性剤の非存在下でも容易に溶解し得る物質であれば、特に限定されないが、その溶解性の好ましい例示としては、水、例えば注射用蒸留水に対して（トリトンX-100 やポリドカノール等の界面活性剤の非存在下で、通常は中性付近）、1mg/mL 以上が挙げられ、または10mg/mL 以上、好ましくは30mg/mL 以上、さらに好ましくは60mg/mL 以上、特に好ましくは80mg/mL 以上、または100mg/mL以上がそれぞれ挙げられる。

【0015】

また、トロンビンによるプロテインCの活性化を促進する作用は、例えば、特開昭64-6219 号公報を初めとする各種の公知文献に明確に記載された試験方法によりプロテインCの活性化を促進する作用の活性量やその有無を容易に確認できるものである。可溶性トロンボモジュリンとしては、ヒト尿等を原料とするヒト由来のペプチドや、ヒト由来の遺伝子や DNA等からの変異、または誘導体が好ましい例として挙げられ、例えば、配列表配列番号3の19-132のアミノ酸配列を該ペプチド中に包含していることが好ましく、この場合に、勿論、前述の通り、可溶性トロンボモジュリンであるとの性質が必要となる。この配列表配列番号3の19-132のアミノ酸配列は、トロンビンによるプロテインCの活性化を促進する作用を有する限り自然または人工的に変異していてもよく、すなわち配列表配列番号3の19-132のアミノ酸配列の1つ以上、すなわち1つまたは複数のアミノ酸、さらに好ましくは数個のアミノ酸配列が置換、欠失、付加していても良い。例えば配列表配列番号7の19-132のアミノ酸配列、すなわち配列表配列番号3のアミノ酸配列中の125位の Valが Alaに置換された配列からなるペプチド、またはそれらを包含するペプチドも本発明に用いることができる。許容される変異の程度は、活性を有する限り特に限定されないが、例えばアミノ酸配列として50%、好

ましくは70%、特に好ましくは80%、さらに好ましくは90%または95%以上相同であることが例示される。後述の通り、これらの変異については通常の遺伝子操作技術を用いれば容易に取得可能である。

【0016】

また、本発明に用いることのできる可溶性トロンボモジュリンとしては、例えば、配列表配列番号1のアミノ酸配列をコードするDNAをベクターにより宿主細胞にトランスフェクトして調製された形質転換細胞より取得されるペプチドが挙げられる。この形質転換細胞により取得されるペプチドとしては、配列表配列番号1の19-516位のアミノ酸配列からなるペプチドが好ましい例として挙げられる。また上述の通り、この配列表配列番号1の19-516のアミノ酸配列は、トロンビンによるプロテインCの活性化を促進する作用を有する限り自然または人工的に変異していてもよく、すなわち配列表配列番号1の19-516のアミノ酸配列の1つ以上、すなわち1つまたは複数のアミノ酸、さらに好ましくは数個のアミノ酸が置換、欠失、付加していても良い。例えば配列表配列番号5の19-516のアミノ酸配列、すなわち配列表配列番号1のアミノ酸配列中の473位のValがAlaに置換された配列からなるペプチドも本発明に用いることができる。その他に宿主細胞によっては、シグナル部分がそのままや、前記配列表配列番号1の17-516位のアミノ酸配列からなるペプチド、またはそれらの混合物であってもよい。勿論これらのペプチドは極めて溶解性が高いもので、前述の溶解性を十分に有するものである。本発明において、上記の配列表配列番号1の19-516位のアミノ酸配列からなるペプチドは特に好ましい。

【0017】

また、可溶性トロンボモジュリンが、配列表配列番号4または8の55-396の塩基配列の相補DNAに対してストリンジントな条件下にてハイブリダイズできるDNAによりコードされるペプチドであり、トロンビンのプロテインCの活性化を促進する作用を有し、且つ界面活性剤の非存在下で溶解し得ることのできることも好ましい。ストリンジントな条件とは、相補DNAが目的のDNAと特異的にハイブリダイズできる条件であって、例えば、相補DNAにDNA、RNA、合成DNAを用いてハイブリダイズさせ、その後、非特異的に目的のDNA以外にハイブリダイ

ズした相補 DNA を洗い流す条件を言う。例えば、Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) を参考にして決定すればよい。例えば、42℃で、6×SSC、5×Denhardt's reagent、0.5% SDS、100 μg/mL denatured, fragmented salmon sperm DNA、50%ホルムアミド中ハイブリダイズせしめ、68℃で、0.1×SSC、0.5% SDS にて洗浄してもハイブリダイズするものが挙げられる。

## 【0018】

さらに、これらのペプチドは、前記のアミノ酸配列を有すればよいのであって、糖鎖が付いていても、又付いていなくともよく、この点は特に限定されるものではない。また遺伝子操作においては、使用する宿主細胞の種類により、糖鎖の種類や、付加位置や付加の程度は相違するものであり、いずれも用いることができる。後述の通り、遺伝子操作により取得することに特定されるものではないが、遺伝子操作により取得する場合には、発現に際して用いることができるシグナル配列としては、上述の配列表配列番号1の1-18のアミノ酸配列からなる塩基配列、その他公知のシグナル配列、例えば、ヒト組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)のシグナル配列を利用することができる(国際公開 88/9811号公報参照のこと)。

## 【0019】

可溶性トロンボモジュリンをコードする DNA 配列を宿主細胞へ導入する場合には、好ましくは可溶性トロンボモジュリンをコードする DNA 配列を、ベクター、特に好ましくは、動物細胞において発現可能な発現ベクターに組み込んで導入する方法が挙げられる。発現ベクターとは、プロモーター配列、mRNA にリボソーム結合部位を付与する配列、発現したい蛋白をコードする DNA 配列、スプライシングシグナル、転写終結のターミネーター配列、複製起源配列などで構成される DNA 分子であり、好ましい動物細胞発現ベクターの例としては、R.C. Mulligan ら [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 2072 (1981)] が報告している pSV2-X や、P. M. Howley ら [Method in Enzymology, 101, 387, Academic Press (1983)] が報告している pBP69T (69-6) などが挙げられる。

これらのペプチドを製造するに際して用いることのできる宿主細胞としては、

チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、COS-1細胞、COS-7細胞、VERO(ATCC CCL-81)細胞、BHK細胞、イヌ腎由来MDCK細胞、ハムスターAV-12-664細胞等が、またヒト由来細胞としてHeLa細胞、WI38細胞、ヒト293細胞等が挙げられる。CHO細胞においては、DHFR-CHO細胞がさらに好ましい。

## 【0020】

また、遺伝子操作の過程やペプチドの製造過程において、大腸菌等の微生物も多く使われ、それぞれに適した宿主-ベクター系を使用することが好ましく、上述の宿主細胞においても、適宜のベクター系を選択することができる。遺伝子組換え技術に用いる可溶性トロンボモジュリンの遺伝子は、クローニングされており、そして可溶性トロンボモジュリンの遺伝子組換え技術を用いた製造例が開示されており、さらにはその精製品を得るための精製方法も知られている〔特開昭64-6219号公報、特開平2-255699号公報、特開平5-213998号公報、特開平5-310787号公報、特開平7-155176号公報、J.Biol.Chem.,264:10351-10353(1989)〕。したがって本発明の可溶性トロンボモジュリンは、上記の報告に記載されている方法を用いることにより、あるいはそれらに記載の方法に準じることにより製造することができる。例えば特開昭64-6219号公報では、全長のトロンボモジュリンをコードするDNAを含むプラスミドpSV2TMJ2を含む、*Escherichia coli* K-12 strain DH5(ATCC 寄託番号 67283号)が開示されている。また、この菌株を生命研(現独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター)に再寄託した菌株(*Escherichia coli* DH5/pSV2TM J2)(FERMBP-5570)を用いることもできる。この全長のトロンボモジュリンをコードするDNAを原料として、公知の遺伝子操作技術によって、本発明の可溶性トロンボモジュリンを調製することができる。

## 【0021】

本発明に用いられる可溶性トロンボモジュリンは、従来公知の方法またはそれに準じて調製すればよいが、例えば、前記山本らの方法〔特開昭64-6219号公報〕、または特開平5-213998号公報を参考にすることができる。すなわちヒト由来の可溶性トロンボモジュリン遺伝子を遺伝子操作技術により、例えば、配列表配列番号1のアミノ酸配列をコードするDNAとなし、さらに必要に応じた改変を行うことも可能である。この改変としては、メソッド イン エンザイモロジー〔

Method in Enzymology,100:468 (1983 年), アカデミックプレス(Academic Press)] に記載の方法に従って、部位特異的変異を行う。例えば、配列表配列番号 1 の第1418位の塩基Tは、変異用合成 DNAを用いて塩基Cに変換した DNAとなすことができる。

#### 【0022】

このようにして調製した DNAを、例えばチャイニーズハムスター卵巣 (CHO)細胞に組み込んで、形質転換細胞とし、適宜選択し、この細胞を培養して得た培養液から、公知の方法により精製された可溶性トロンボモジュリンが製造できる。前述の通り配列表配列番号 1 のアミノ酸配列をコードする DNAを前記宿主細胞にトランスフェクトすることが好ましい。本発明に用いられる可溶性トロンボモジュリンの生産方法は、上記の方法に限定されるものではなく、例えば、尿や血液、その他体液等から抽出精製することでも可能であるし、また可溶性トロンボモジュリンを生産する組織またはこれら組織培養液等から抽出精製することも、また必要によりさらに蛋白分解酵素により切断処理することも可能である。

#### 【0023】

次いで上記により取得された培養上清、または培養物からの可溶性トロンボモジュリンの単離精製方法は、公知の手法〔堀尾武一編集、蛋白質・酵素の基礎実験法〕に準じて行なうことができる。例えば、可溶性トロンボモジュリンと逆の電荷を持つ官能基を固定化したクロマトグラフィー担体と、可溶性トロンボモジュリンの間の相互作用を利用したイオン交換クロマトグラフィーや吸着クロマトグラフィーの使用も好ましい。また、可溶性トロンボモジュリンとの特異的親和性を利用したアフィニティークロマトグラフィーも好ましい例として挙げられる。吸着体の好ましい例として、可溶性トロンボモジュリンのリガンドであるトロンピンや可溶性トロンボモジュリンの抗体を利用する例が挙げられる。これらの抗体としては、適宜の性質、或いは適宜のエピトープを認識する可溶性トロンボモジュリンの抗体を利用することができ、例えば、特公平 5-42920号公報、特開昭64-45398号公報、特開平6-205692号公報などに記載された例が挙げられる。また、可溶性トロンボモジュリンの分子量サイズを利用した、ゲル濾過クロマトグラフィーや限外濾過が挙げられる。そしてまた、疎水性基を固定化したクロマト

グラフィー担体と、可溶性トロンボモジュリンのもつ疎水性部位との間の疎水結合を利用した疎水性クロマトグラフィーが挙げられる。また、吸着クロマトグラフィーとしてハイドロキシアパタイトを担体として用いることも可能であり、例えば、特開平9-110900号公報に記載した例が挙げられる。これらの手法は適宜組み合わせることができる。精製の程度は、使用目的等により選択できるが、例えば電気泳動、好ましくはSDS-PAGEの結果が単一バンドとして得られるか、もしくは単離精製品のゲル濾過HPLCまたは逆相HPLCの結果が単一のピークになるまで純粋化することが望ましい。

## 【0024】

もちろん、複数種の可溶性トロンボモジュリンを用いる場合には、実質的に可溶性トロンボモジュリンのみのバンドになることが好ましいのであり、単一のバンドになることを求めるものではない。

本発明における精製法を具体的に例示すれば、可溶性トロンボモジュリン活性を指標に精製する法が挙げられ、例えばイオン交換カラムのQ-セファロースFast Flow で培養上清または培養物を粗精製し可溶性トロンボモジュリン活性を有する画分を回収し、ついでアフィニティークラムのDIP-トロンビン-アガロース(diisopropylphosphorylthrombin agarose)カラムで主精製し可溶性トロンボモジュリン活性が強い画分を回収し、回収画分を濃縮し、ゲルろ過にかけ可溶性トロンボモジュリン活性画分を純品として取得する精製方法 [Gomi K. ら、Blood、75:1396-1399 (1990)] が挙げられる。指標とする可溶性トロンボモジュリン活性としては、例えばトロンビンによるプロテインC活性化の促進活性が挙げられる。その他に、好ましい精製法を例示すると以下の通りである。

## 【0025】

可溶性トロンボモジュリンと良好な吸着条件を有する適当なイオン交換樹脂を選定し、イオン交換クロマト精製を行なう。特に好ましい例としては、0.18M NaCl を含む 0.02M トリス塩酸緩衝液(pH7.4) で平衡化したQ-セファロースFast Flow を用いる方法である。適宜洗浄後、例えば0.3M NaCl含む0.02M トリス塩酸緩衝液(pH7.4) で溶出し粗精製品の可溶性トロンボモジュリンを得ることができる。



## 【0026】

次に、例えば可溶性トロンボモジュリンと特異的親和性を持つ物質を樹脂に固定化しアフィニティークロマト精製を行なうことができる。好ましい例としてDIP-トロンビン-アガロースカラムの例と、抗可溶性トロンボモジュリンモノクローナル抗体カラムの例が挙げられる。DIP-トロンビン-アガロースカラムは、予め、例えば、100mM NaCl および0.5mM 塩化カルシウムを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)で平衡化せしめ、上記の粗精製品をチャージして、適宜の洗浄を行い、例えば、1.0M NaCl 及び0.5mM 塩化カルシウムを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)で溶出し精製品の可溶性トロンボモジュリンを取得することができる。また抗可溶性トロンボモジュリンモノクローナル抗体カラムにおいては、予めCN Brにより活性化したセファロース4FF(ファルマシア社)に、抗可溶性トロンボモジュリンモノクローナル抗体を溶解した 0.5M NaCl含有0.1M NaHCO<sub>3</sub> 緩衝液(pH8.3)に接触させ、セファロース4FFに抗可溶性トロンボモジュリンモノクローナル抗体をカップリングさせた樹脂を充填したカラムを、予め例えば0.3M NaCl含む20mMリン酸塩緩衝液(pH7.3)で平衡化し、適宜の洗浄の後、例えば、0.3M NaCl含む100mM グリシン塩酸緩衝液(pH3.0)にて溶出せしめる方法が例示される。溶出液は適当な緩衝液で中和し、精製品として取得することもできる。

## 【0027】

次に得られた精製品をpH3.5に調整した後に、0.3M NaCl を含む100mM グリシン塩酸緩衝液(pH3.5)で平衡化した陽イオン交換体、好ましくは強陽イオン交換体である SP-セファロースFF(ファルマシア社)にチャージし、同緩衝液で洗浄して得られた非吸着画分を得る。得られた画分は適当な緩衝液で中和し、高純度精製品として取得することができる。これらは、限外濾過により濃縮することが好ましい。

## 【0028】

さらに、ゲル濾過による緩衝液交換を行なうことも好ましい。例えば、50mM NaClを含む20mMリン酸塩緩衝液(pH7.3)で平衡化せしめた Sephacryl S-300カラムもしくはS-200 カラムに、限外濾過により濃縮した高純度精製品をチャージし、50mM NaClを含む20mMリン酸塩緩衝液(pH7.3)で展開分画し、トロンビンによ

るプロテインCの活性化の促進活性の確認を行ない活性画分を回収し緩衝液交換した高純度精製品を取得することができる。このようにして得られた高純度精製品は安全性を高めるために適当なウイルス除去膜、例えばプラノバ15N（旭化成株式会社）を用いてろ過することが好ましく、その後限外濾過により目的の濃度まで濃縮することができる。最後に無菌濾過膜により濾過することが好ましい。

## 【0029】

本発明のグルタミン酸は、光学活性体であるD体、またはL体のいずれか、またはそれらの混合物であるラセミ体のいずれであっても良いが、L体であることが好ましい。グルタミン酸の塩としては、水溶性の塩であることが好ましく、例えばその酸付加塩が好ましい例として挙げられる。酸付加塩の場合、付加しうる酸として通常、塩酸、硫酸、硝酸、酢酸、リン酸、シュウ酸、クエン酸、酒石酸などが例示されるが、好ましくは塩酸、酢酸、リン酸であり、さらに好ましくは塩酸が挙げられる。また、他の塩としては、アンモニウム塩が好ましい例として挙げられる。また、例えばアルカリ金属やアルカリ土類金属との塩も好ましい例として挙げられる。アルカリ金属としては、例えばナトリウム、カリウム、リチウムなどが挙げられ、好ましくはナトリウム、カリウムであり、さらに好ましくはナトリウムが挙げられる。また、アルカリ土類金属との塩も好ましい例として挙げられる。アルカリ土類金属としては例えばマグネシウム、カルシウム、ベリリウムなどが挙げられ、好ましくはマグネシウム、カルシウムであり、さらに好ましくはカルシウムである。これらのグルタミン酸およびその塩は、無水物の他、適宜の水和物が利用できる。具体的には、グルタミン酸ナトリウム一水和物が好ましい例として挙げられる。なお、これらのグルタミン酸およびその塩の添加量を考慮する際には、特別にことわりのない限り、フリー体のグルタミン酸としての換算値として表示する。

## 【0030】

また、マンニトールは、D体、またはL体のいずれか、またはそれらの混合物のいずれであっても良いが、D-マンニトールが好ましい例として挙げられる。

また、リシン（リジンとも言う）は、光学活性体であるD体、またはL体のい

ずれか、またはそれらの混合物であるラセミ体のいずれであっても良いが、L体であることが好ましい。リシンの塩としては、水溶性の塩であることが好ましく、例えばその酸付加塩が好ましい例として挙げられる。酸付加塩の場合、付加する酸として通常、塩酸、硫酸、硝酸、酢酸、リン酸、シュウ酸、クエン酸、酒石酸などが例示されるが、好ましくは塩酸、酢酸、リン酸であり、さらに好ましくは塩酸が挙げられる。これらのリシンおよびその塩は、無水物の他、適宜の水和物が利用できる。具体的には、リシン水和物が好ましい例として挙げられる。なお、これらのリシンおよびその塩の添加量を考慮する際には、特別にことわりのない限り、フリー体のリシンとしての換算値として表示する。

## 【0031】

また、グルタミン酸またはその塩、および、リシンまたはその塩の組み合わせを実施する際には、一括して、リシングルタミン酸塩無水物やリシングルタミン酸塩二水和物などを利用することも好ましい例として挙げられる。このリシングルタミン酸塩二水和物の量を考慮する際には、リシンとグルタミン酸とに分けての換算値として表示する。

また、アスパラギン酸は、光学活性体であるD体、またはL体のいずれか、またはそれらの混合物であるラセミ体のいずれであっても良いが、L体であることが好ましい。アスパラギン酸の塩としては、水溶性の塩であることが好ましく、例えばアルカリ金属やアルカリ土類金属との塩も好ましい例として挙げられる。アルカリ金属としては、例えばナトリウム、カリウム、リチウムなどが挙げられ、好ましくはナトリウム、カリウムであり、さらに好ましくはナトリウムが挙げられる。また、アルカリ土類金属との塩も好ましい例として挙げられる。アルカリ土類金属としては例えばマグネシウム、カルシウム、ベリリウムなどが挙げられ、好ましくはマグネシウム、カルシウムであり、さらに好ましくはカルシウムである。これらのアスパラギン酸およびその塩は、無水物の他、適宜の水和物が利用できる。具体的には、アスパラギン酸ナトリウム一水和物が好ましい例として挙げられる。なお、これらのおよびその塩の添加量を考慮する際には、特別にことわりのない限り、フリー体のアスパラギン酸としての換算値として表示する。

## 【0032】

浸透圧比は、生理食塩液の与えるオスモル濃度に対する試料溶液のオスモル濃度の比と定義（第14改正日本薬局方、浸透圧測定法）され、生理食塩液(0.900 g/100mL)のオスモル濃度は一定(286mOsm)であることから、次式で計算することができる[浸透圧比=試料溶液のオスモル濃度(mOsm)/286(mOsm)]。なお、オスモル濃度は、第14改正日本薬局方の浸透圧測定法、あるいは USP24<785>OSMOLARITY に記載の方法で求めることができ、単位は mOsm(milliosmoles per liter)を用いて示す。

本発明の製剤を、0.1mL から2mL の水に溶解し得るものであって、その溶解時の浸透圧比が 0.5から2.0 であることが特徴とされる。溶解し得るとは、溶解した後例えば白色光源の直下、約1000ルクスの明るさの位置で、肉眼で観察する時、澄明であって、明らかに認められるような程度の不溶性異物を含まないことをいう。水としては、例えば、蒸留水、生理食塩液、またはブドウ糖液等が挙げられ、蒸留水が特に好ましい例として挙げられる。さらに、上記の浸透圧比としては、0.8 以上が好ましく、上限としては、1.5 以下が好ましく、特に好ましくは1.2 以下が挙げられる。

## 【0033】

本発明の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤は、可溶性トロンボモジュリンの量として、製剤あたり、5mg以上含むことが通常であり、10mg以上含むことが好ましく、15mg以上がさらに好ましい。またさらに、20mg以上が好ましく、30mg以上含むことも特に好ましい例として挙げられる。

本発明の製剤中に添加される可溶性トロンボモジュリン以外の、上述の2種の添加物の添加量の比は、互いに50:50 が特に好ましい例であり、また、60:40 ~ 40:60 も好ましい例として挙げられ、さらにまた 80:20~20:80 も例示される。おのこの添加量は、適宜選択できるが、例えば、可溶性トロンボモジュリン1mgあたりの添加量の下限として、通常 0.0001mmol 以上が例示され、好ましくは 0.0003mmol 以上、より好ましくは 0.0007mmol 以上、特に好ましくは0.001mmol 以上が例示される。また、可溶性トロンボモジュリン1mgあたりの添加量の上限として、通常 1mmol以下が例示され、好ましくは0.7mmol 以下、より好ましく

は0.3mmol 以下、特に好ましくは0.1mmol 以下が例示される。上記の添加量としては、本発明の安定化効果を示し、且つ浸透圧比の範囲に調整できる添加量であれば特に限定されず、例えば塩酸塩やナトリウム塩のように水に溶解した時に電離（解離）する添加剤の場合は浸透圧比が高くなるので添加量を、上述の例示された添加量を適宜増減し、求められる浸透圧比に適宜調整することが好ましい。

#### 【0034】

本発明で上記安定化剤を含む可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤においては、上記安定化剤の他に第3成分として医薬品の添加剤として許容できる、等張化剤、緩衝化剤、増粘剤、界面活性剤、保存剤、防腐剤、無痛化剤、pH調整剤などを適宜添加しても良い。界面活性剤としては、例えばポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油50、ポリソルベート80、ポリソルベート20、ポリオキシエチレン(160) ポリオキシプロピレン(30)グリコールなどが挙げられる。

#### 【0035】

本発明の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤の製造に際しては、適宜の方法が採用できるが、例えば、適当量の可溶性トロンボモジュリンと上述の添加物、またはその溶液を、同時または順次混合して全ての組成物の混合溶液を調製し、公知の方法により凍結乾燥することにより、凍結乾燥時の変成等に対する安定性の高い、長期間保存の可能な製剤として調製することが可能である。例えば、上記安定化のための添加物や第3成分の添加剤の添加方法は、直接可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液に添加する方法、または、あらかじめ安定化剤や第3成分の添加剤を水、注射用水、あるいは適当な緩衝液に溶解後、可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液に添加する方法などが挙げられる。添加時期はいつでも良いが、好ましくは可溶性トロンボモジュリンの精製過程や濃縮過程であり、さらに好ましくは製剤化工程中である。また、製剤化工程中で溶液のpHは、特に好ましくは中性付近が例示される。さらに、そのpHの下限としては、通常pH 4 以上、好ましくはpH 5 以上、より好ましくはpH 6 以上、特に好ましくはpH 6.5 以上が例示される。また、pHの上限としては通常pH 11 以下が例示され、好ましくはpH 10 以下、より好ましくはpH 9 以下、さらに好ましくはpH 8 以下、特に好

ましくはpH7.5 以下が例示される。前述のpHとなすためには、必要により、適宜のpH調整剤などを添加して調整すれば良い。pH調整剤としては、例えば塩酸、酢酸、クエン酸、リン酸、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどが例示され、好ましくは塩酸、水酸化ナトリウムなどである。調整時期は特に限定されないが、無菌ろ過工程の直前が好ましい。また、可溶性トロンボモジュリンの精製過程や濃縮過程でも良い。調整方法は特に限定されないが、サンプリングした溶液のpHをpH測定装置で測り、例えばpHが低ければ水酸化ナトリウム水溶液を滴下してpHを調整すればよい。

## 【0036】

上記のように製剤化工程で調製した可溶性トロンボモジュリンおよび安定化剤を含み、所望により適宜の第3の添加剤を含有してなる溶液を、例えば0.22 $\mu$ mのフィルターを通して無菌ろ過することが好ましい。かくして得られた可溶性トロンボモジュリンおよび安定化剤を含み、適宜第3の添加剤を含有してなる溶液を容器に充填し、そのまま密封して製剤としてもよいが、凍結乾燥することがより好ましい。凍結乾燥方法は特に制限はなく、通常の方法で凍結乾燥することができる。容器に充填され、凍結乾燥される溶液の量として、特に好ましくは0.5から1.0mLが例示される。すなわち、その下限としては0.1mL以上が好ましく、より好ましくは0.3mL以上、特に好ましくは0.5mL以上が例示される。また、溶液の量の上限としては通常10mL以下が例示され、好ましくは5mL以下、より好ましくは2mL以下、特に好ましくは1mL以下が挙げられる。

## 【0037】

容器としては、医薬品の容器として使用可能なもので無菌充填することに適した材料、形状であれば特に限定されないが、例えばガラス製バイアル（および栓）、ガラス製シリンジ（さらにゴム製キャップおよびストッパー）、ガラス製アンプルなどが挙げられ、その他に上記のプラスチック製容器を用いることもできる。本発明において、ガラス製バイアルに封入せしめた凍結乾燥製剤として提供することが好ましい。また、例えば再溶解用の水が充填済みであるガラス製アンプルや、再溶解用の水が充填済みであるプレフィルドシリンジを添付溶解液として、充填凍結乾燥製剤とともに提供することも好ましい。また、ガラス製または

プラスチック製のダブルチャンバーあるいはデュアルチャンバーと言われる2室式シリンジ（1本のシリンジに2室があり、例えば1室に凍結乾燥物を、もう1室に溶解のための水が封入されている）も好ましい。また、2室式シリンジの別タイプとして、製造や流通時は2室が分離しており、使用時に組合せることにより1体となるタイプも好ましい。

#### 【0038】

上述は、本発明の別の態様である、前述の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤と、その製剤の溶解のための水とが組み合わされたキット製剤を提供するものである。

可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤の溶解のための水としては、例えば、蒸留水、生理食塩液、またはブドウ糖液等が挙げられ、蒸留水が特に好ましい例として挙げられる。また、その水の容量は、通常、0.1mL 以上、好ましくは0.3mL 以上、さらに好ましくは0.5mL 以上が例示される。また、その容量の上限としては、通常5mL 以下、好ましくは3mL 以下、さらに好ましくは2mL 以下、特に好ましくは1.5mL 以下が例示される。さらに、その容量は、通常は、約0.5mL または約1mL であることが特に好ましい。

#### 【0039】

本発明の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤は、製剤として流通時または使用までの間、数ヶ月～数年間保存されることができる。その投与方法としては、一般的に使用されている投与方法、すなわち非経口投与方法、例えば静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与等によって投与することができるが、特に筋肉内投与、皮下投与に用いることが最も好ましい。凍結乾燥製剤とした場合は、用時に、水、例えば蒸留水（または、注射用水）等にて溶解して患者に投与することができるが、前述の通りであって、特に筋肉内投与、皮下投与に用いる場合には、0.1mL から2mL 、好ましくは 0.3mL から1.5mL 、特に好ましくは0.5mL から1mL 程度が例示される。

#### 【0040】

本発明の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤の投与量は、患者の年齢、体重、疾患の程度、投与経路などによっても異なるが、一般的に可溶性トロンボ

モジュリンの量として体重あたり0.001 から 5mg/kg の範囲であり、好ましくは 0.02から2mg/kg、さらに好ましくは0.05から1mg/kg、特に好ましくは 0.1から0.5mg/kgが挙げられ、1日あたり1回または必要に応じて数回投与する。投与間隔は毎日でも良いが、好ましくは2日から14日間に1回、さらに好ましくは3日から10日間に1回、さらに好ましくは4日から7日に1回とすることも可能である。特に、筋肉内投与、皮下投与においては、大量投与しても安全であり、且つ血中濃度が長期間維持されることより、投与間隔を長くできるので、好ましい。

#### 【0041】

また、本発明は、有効成分として可溶性トロンボモジュリンを10mg以上含有する可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤であって、(1) 尿素、または(2) 尿素およびアミノ酸を含有せしめ、且つ該製剤が、0.1mL から2mL の水に溶解し得るものであって、その溶解時の浸透圧比が 0.5から2.0 であることを特徴とする可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を提供するものである。また、その安定化方法である。

#### 【0042】

本発明の可溶性トロンボモジュリンとは前述と同様であり、その製剤中での含有量も前述と同様であり、例えば、通常は10mg以上含有することが例示され、15mg以上含有することがさらに好ましい例として挙げられる。

尿素は、酸付加塩であってもよく、例えば尿素リン酸塩、尿素硝酸塩などが挙げられるが、好ましくは尿素である。なお、これらの尿素およびその酸付加塩の添加量を考慮する際には、特別にことわりのない限り、フリー体の尿素としての換算値として表示する。

尿素と組み合わせることのできるアミノ酸としては、グルタミン酸またはその塩、アスパラギン酸またはその塩が好ましい例として例示される。これらのアミノ酸やその塩についての詳細な例示は前述の通りである。添加物の比率、添加量、浸透圧比は前述と同様である。基本的に製造方法や投与方法、用量等は前述の開示が参考にできる。

#### 【0043】

#### 【実施例】



以下、参考例、実施例、比較例、投与例および実験例により本発明を具体的に説明するが、本発明は何らこれらによって限定されるものではない。

【参考例 1】

本実施例で用いる可溶性トロンボモジュリンの生産

実施例に用いる可溶性トロンボモジュリンは、前記山本らの方法（特開昭64-6219号公報の実施例10に記載の方法）に従い生産し、さらに限外濾過により濃縮を行って得た。すなわち配列表配列番号1のアミノ酸配列をコードする DNA（具体的には、配列表配列番号2の塩基配列よりなる）を、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞にトランスフェクションして、この形質転換細胞の培養液より上述あるいは定法の精製法にて、50mM NaClを含む20mMリン酸塩緩衝液(pH7.3)で活性画分を回収した高純度精製品を取得した。さらに、限外濾過を行って可溶性トロンボモジュリン濃度が60mg/mLであるTMD123Hを取得した。同様に、配列表配列番号3のアミノ酸配列をコードする DNA（具体的には、配列表配列番号4の塩基配列よりなる）を用いることにより、配列表配列番号3のアミノ酸配列の19-132のアミノ酸を少なくとも有するペプチド（以下、TME456Hと略することがある）を取得した。

【0044】

また、配列表配列番号2の塩基配列を含む DNA断片および配列表配列番号9に示された塩基配列を有する変異用合成 DNAを用いて前述の部位特異的変異を行い、配列表配列番号5のアミノ酸配列をコードする DNA（具体的には、配列表配列番号6の塩基配列よりなる）を取得した。この DNA配列をCHO細胞にトランスフェクションして、この形質転換細胞の培養液より上述あるいは定法の精製法にて、50mM NaClを含む20mMリン酸塩緩衝液(pH7.3)で活性画分を回収した高純度精製品を取得した。さらに、限外濾過を行って可溶性トロンボモジュリン濃度が60mg/mLである配列表配列番号5のアミノ酸配列の19-516のアミノ酸を少なくとも有するペプチド（以下、TMD123HMと略することがある）を取得した。同様に、配列表配列番号4の塩基配列を含む DNA断片および配列表配列番号9に示された塩基配列を有する変異用合成 DNAを用いて前述の部位特異的変異を行い、配列表配列番号7のアミノ酸配列をコードする DNA（具体的には、配列表配列番号8の塩基

配列よりなる)を取得した。この DNA配列をCHO 細胞にトランスフェクションし、上述の方法にて配列表配列番号7のアミノ酸配列の19-132のアミノ酸を少なくとも有するペプチド(以下、TME456HMと略すことがある)を取得した。

【0045】

#### 【実施例1】

##### 添加剤溶液調製

20mLのメスフラスコに表1記載の添加剤量の50倍量のL-グルタミン酸ナトリウム一水和物(和光純薬)2.5mmol およびD(-)-マンニトール(和光純薬)2.5mmolを量り入れ、注射用水(大塚製薬株式会社)を加え溶解して20mLとした。

##### 試料溶液調製

上記添加剤溶液 4mLを15mLのアシストチューブに入れ、参考例1で得られたTM D123H を5mL(可溶性トロンボモジュリンとして表1記載の10倍量にあたる300mg含有する)および注射用水を1mL 加え、混合攪拌した。この試料溶液をディスポシリンジ25mL(テルモ製)を用い、孔径:0.22 $\mu$ m(ミリポア製MILLEX-GV)のフィルターを付けてろ過滅菌し、無菌バイアルビン(不二硝子製3010)に1mLずつ分注した。

【0046】

##### 凍結乾燥

ゴム栓(大協精工製)半打栓→凍結乾燥→窒素充填→ゴム栓打栓→キャップ巻締め順で以下の条件にて凍結乾燥工程を行い、1容器中に可溶性トロンボモジュリン30mg、L-グルタミン酸ナトリウム一水和物0.05mmol、D(-)-マンニトール0.05mmolを含む可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た(実施例1-1)。

【0047】

##### 〔凍結乾燥条件〕

予備冷却(15分かけて室温から15℃)→ 本冷却(2時間かけて15℃から-45℃)→ 保持(2時間 -45℃)→ 真空開始(18時間 -45℃)→ 昇温(20時間かけて -45℃から25℃)→ 保持(15時間25℃)→ 昇温(1時間かけて25℃から45℃)→ 保持(5時間45℃)→ 室温(2時間かけて45℃から25℃)→ 復圧窒素充填(-100mmHgまで)→ 打栓 → キャップ巻締め

同様に、実施例1-1 のTMD123H の代わりにTMD123HM（実施例1-2）、TME456H（実施例1-3）、およびTME456HM（実施例1-4）を用いて、それぞれ上記の方法にしたがって可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た。

【0048】

【表1】

実施例及び比較例	組成	1容器当りの添加量
実施例1-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸Na一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol
実施例1-2	TMD123HM	30mg
	L-グルタミン酸Na一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol
実施例1-3	TME456H	30mg
	L-グルタミン酸Na一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol
実施例1-4	TME456HM	30mg
	L-グルタミン酸Na一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol
実施例2-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸Na一水和物	0.075mmol
	D(-)-マンニトール	0.075mmol
実施例3-1	TMD123H	30mg

L-グルタミン酸Na一水和物	0.025mmol
D(-)-マンニトール	0.025mmol

実施例4-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸Na一水和物	0.02mmol
	D(-)-マンニトール	0.10mmol

実施例5-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸Na一水和物	0.07mmol
	D(-)-マンニトール	0.02mmol

実施例6-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸Na一水和物	0.03mmol
	D(-)-マンニトール	0.15mmol

実施例7-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸Na一水和物	0.10mmol
	D(-)-マンニトール	0.03mmol

実施例8-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸Na一水和物	0.05mmol
	L-リシン塩酸塩	0.05mmol

実施例9-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸Na一水和物	0.03mmol
	L-リシン塩酸塩	0.07mmol

実施例10-1	TMD123H	30mg
	(L-リシン-L-グルタミン酸塩二水和物)	

リシン	0.10mmol
グルタミン酸	0.10mmol

---

実施例11-1	TMD123H	30mg
	(L-リシン-L-グルタミン酸塩二水和物)	
	リシン	0.15mmol
	グルタミン酸	0.15mmol

---

実施例12-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸Na一水和物	0.06mmol
	L-アスパラギン酸Na一水和物	0.06mmol

---

実施例13-1	TMD123H	30mg
	L-アスパラギン酸Na一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol

---

実施例14-1	TMD123H	30mg
	尿素	0.07mmol

---

実施例15-1	TMD123H	30mg
	尿素	0.05mmol
	L-グルタミン酸Na一水和物	0.05mmol

---

実施例16-1	TMD123H	30mg
	尿素	0.05mmol
	L-アスパラギン酸Na一水和物	0.05mmol

---

実施例17-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸Na一水和物	0.05mmol

---

D(-)-マンニトール	0.05mmol
-------------	----------

実施例18-1	TMD123H	30mg
	L-アスパラギン酸Na一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol

実施例19-1	TMD123H	15mg
	L- グルタミン酸Na一水和物	0.025mmol
	D(-)-マンニトール	0.025mmol

実施例20-1	TMD123H	10mg
	L-グルタミン酸Na一水和物	0.017mmol
	D(-)-マンニトール	0.017mmol

実施例21-1	TMD123H	15mg
	L-グルタミン酸Na一水和物	0.038mmol
	D(-)-マンニトール	0.038mmol

実施例22-1	TMD123H	10mg
	L-グルタミン酸Na一水和物	0.025mmol
	D(-)-マンニトール	0.025mmol

実施例23-1	TMD123H	15mg
	L-グルタミン酸Na一水和物	0.0125mmol
	D(-)-マンニトール	0.0125mmol

実施例24-1	TMD123H	10mg
	L-グルタミン酸Na一水和物	0.0083mmol
	D(-)-マンニトール	0.0083mmol

実施例25-1	TMD123H	30mg
	L-アスパラギン酸Na-水和物	0.075mmol
	D(-)-マンニトール	0.075mmol
実施例26-1	TMD123H	30mg
	L-アスパラギン酸Na-水和物	0.025mmol
	D(-)-マンニトール	0.025mmol
実施例27-1	TMD123H	30mg
	L-アスパラギン酸Na-水和物	0.02mmol
	D(-)-マンニトール	0.10mmol
実施例28-1	TMD123H	30mg
	L-アスパラギン酸Na-水和物	0.07mmol
	D(-)-マンニトール	0.02mmol
実施例29-1	TMD123H	30mg
	L-アスパラギン酸Na-水和物	0.03mmol
	D(-)-マンニトール	0.15mmol
実施例30-1	TMD123H	30mg
	L-アスパラギン酸Na-水和物	0.10mmol
	D(-)-マンニトール	0.03mmol
実施例31-1	TMD123H	15mg
	L-アスパラギン酸Na-水和物	0.025mmol
	D(-)-マンニトール	0.025mmol

実施例32-1	TMD123H	10mg
	L-アスパラギン酸Na-水和物	0.017mmol
	D(-)-マンニトール	0.017mmol
実施例33-1	TMD123H	15mg
	L-アスパラギン酸Na-水和物	0.038mmol
	D(-)-マンニトール	0.038mmol
実施例34-1	TMD123H	10mg
	L-アスパラギン酸Na-水和物	0.025mmol
	D(-)-マンニトール	0.025mmol
実施例35-1	TMD123H	15mg
	L-アスパラギン酸Na-水和物	0.0125mmol
	D(-)-マンニトール	0.0125mmol
実施例36-1	TMD123H	10mg
	L-アスパラギン酸Na-水和物	0.0083mmol
	D(-)-マンニトール	0.0083mmol
比較例1	TMD123H	15mg
	L-アルギニン-塩酸塩	0.75mmol
	スクロース	0.75mmol
比較例2	TMD123H	10mg
	L-アルギニン-塩酸塩	0.5mmol
	スクロース	0.5mmol
比較例3	TMD123H	30mg



比較例4	TMD123H L-グルタミン酸Na一水和物	30mg 0.025mmol
比較例5	TMD123H D(-)- マンニトール	30mg 0.025mmol
比較例6	TMD123H L-グルタミン酸Na一水和物	30mg 0.05mmol
比較例7	TMD123H D(-)- マンニトール	30mg 0.05mmol
比較例8	TMD123H L-グルタミン酸Na一水和物	30mg 0.075mmol
比較例9	TMD123H D(-)- マンニトール	30mg 0.075mmol
比較例10	TMD123H L-アスパラギン酸Na一水和物	30mg 0.025mmol
比較例11	TMD123H L-アスパラギン酸Na一水和物	30mg 0.05mmol
比較例12	TMD123H L-アスパラギン酸Na一水和物	30mg 0.075mmol

【 0 0 4 9 】

## 【実施例 2】

実施例 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（可溶性トロンボモジュリンの種類を変えてそれぞれ 4 種ずつ実施例 2-1、実施例 2-2、実施例 2-3、実施例 2-4）。

【0050】

## 【実施例 3】

実施例 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例 3-1、実施例 3-2、実施例 3-3、実施例 3-4）。

【0051】

## 【実施例 4】

実施例 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例 4-1、実施例 4-2、実施例 4-3、実施例 4-4）。

【0052】

## 【実施例 5】

実施例 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例 5-1、実施例 5-2、実施例 5-3、実施例 5-4）。

【0053】

## 【実施例 6】

実施例 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例 6-1、実施例 6-2、実施例 6-3、実施例 6-4）。

【0054】

## 【実施例 7】

実施例 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例 7-1、実施例 7-2、実施例 7-3、実施例 7-4）。

【0055】

## 【実施例 8】

実施例 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例 8-1、実施例 8-2、実施例 8-3、実施例 8-4）。

【0056】

【実施例 9】

実施例 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例 9-1、実施例 9-2、実施例 9-3、実施例 9-4）。

【 0 0 5 7 】

【実施例 1 0】

実施例 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例 10-1、実施例 10-2、実施例 10-3、実施例 10-4）。

【 0 0 5 8 】

【実施例 1 1】

実施例 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例 11-1、実施例 11-2、実施例 11-3、実施例 11-4）。

【 0 0 5 9 】

【実施例 1 2】

実施例 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例 12-1、実施例 12-2、実施例 12-3、実施例 12-4）。

【 0 0 6 0 】

【実施例 1 3】

実施例 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例 13-1、実施例 13-2、実施例 13-3、実施例 13-4）。

【 0 0 6 1 】

【実施例 1 4】

実施例 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例 14-1、実施例 14-2、実施例 14-3、実施例 14-4）。

【 0 0 6 2 】

【実施例 1 5】

実施例 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例 15-1、実施例 15-2、実施例 15-3、実施例 15-4）。

【 0 0 6 3 】

【実施例 1 6】

実施例 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例16-1、実施例16-2、実施例16-3、実施例16-4）。

【0064】

【実施例 17】

実施例 1 の試料溶液調製で試料溶液を無菌バイアルビンに分注する代わりに 2 室式シリンジ（アルテ製）の 1 室に 1mL ずつ分注した。これらを、ミドル栓半打栓→凍結乾燥→窒素充填→ミドル栓打栓の順で凍結乾燥工程（凍結乾燥条件は実施例 1 と同様）を行った。次にもう 1 室側に注射用水 0.75mL を無菌的に充填し、ゴム栓で封印したのち、プランジャーロッドを取りつけ可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例17-1、実施例17-2、実施例17-3、実施例17-4）。

【0065】

【実施例 18】

実施例13の試料溶液調製で無菌バイアルビンの代わりに 2 室式シリンジ（アルテ製）の 1 室に 1mL ずつ分注した。これらを、ミドル栓半打栓→凍結乾燥→窒素充填→ミドル栓打栓の順で凍結乾燥工程（凍結乾燥条件は実施例 1 と同様）を行った。次にもう 1 室側に注射用水 0.75mL を無菌的に充填し、ゴム栓で封印したのち、プランジャーロッドを取りつけ可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例18-1、実施例18-2、実施例18-3、実施例18-4）。

【0066】

【実施例 19】

実施例 1 で無菌ろ過した試料溶液を無菌バイアルビンに 0.5mL ずつ分注した以外は同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例19-1、実施例19-2、実施例19-3、実施例19-4）。

【0067】

【実施例 20】

実施例 1 で無菌ろ過した試料溶液を無菌バイアルビンに 0.333mL ずつ分注した以外は同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例20-1、実施例20-2、実施例20-3、実施例20-4）。

【 0 0 6 8 】

【実施例 2 1】

実施例 2 で無菌ろ過した試料溶液を無菌バイアルビンに 0.5mL ずつ分注した以外は同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例 21-1、実施例 21-2、実施例 21-3、実施例 21-4）。

【 0 0 6 9 】

【実施例 2 2】

実施例 2 で無菌ろ過した試料溶液を無菌バイアルビンに 0.333mL ずつ分注した以外は同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例 22-1、実施例 22-2、実施例 22-3、実施例 22-4）。

【 0 0 7 0 】

【実施例 2 3】

実施例 3 で無菌ろ過した試料溶液を無菌バイアルビンに 0.5mL ずつ分注した以外は同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例 23-1、実施例 23-2、実施例 23-3、実施例 23-4）。

【 0 0 7 1 】

【実施例 2 4】

実施例 3 で無菌ろ過した試料溶液を無菌バイアルビンに 0.333mL ずつ分注した以外は同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例 24-1、実施例 24-2、実施例 24-3、実施例 24-4）。

【 0 0 7 2 】

【実施例 2 5】

実施例 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例 25-1、実施例 25-2、実施例 25-3、実施例 25-4）。

【 0 0 7 3 】

【実施例 2 6】

実施例 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例 26-1、実施例 26-2、実施例 26-3、実施例 26-4）。

【 0 0 7 4 】

## 【実施例 27】

実施例 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例 27-1、実施例 27-2、実施例 27-3、実施例 27-4）。

【0075】

## 【実施例 28】

実施例 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例 28-1、実施例 28-2、実施例 28-3、実施例 28-4）。

【0076】

## 【実施例 29】

実施例 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例 29-1、実施例 29-2、実施例 29-3、実施例 29-4）。

【0077】

## 【実施例 30】

実施例 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例 30-1、実施例 30-2、実施例 30-3、実施例 30-4）。

【0078】

## 【実施例 31】

実施例 13 で無菌ろ過した試料溶液を無菌バイアルビンに 0.5mL ずつ分注した以外は同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例 31-1、実施例 31-2、実施例 31-3、実施例 31-4）。

【0079】

## 【実施例 32】

実施例 13 で無菌ろ過した試料溶液を無菌バイアルビンに 0.333mL ずつ分注した以外は同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例 32-1、実施例 32-2、実施例 32-3、実施例 32-4）。

【0080】

## 【実施例 33】

実施例 25 で無菌ろ過した試料溶液を無菌バイアルビンに 0.5mL ずつ分注した以外は同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た

(それぞれ実施例33-1、実施例33-2、実施例33-3、実施例33-4)。

【0081】

【実施例34】

実施例25で無菌ろ過した試料溶液を無菌バイアルビンに0.333mLずつ分注した以外は同様の方法で、表1記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た(それぞれ実施例34-1、実施例34-2、実施例34-3、実施例34-4)。

【0082】

【実施例35】

実施例26で無菌ろ過した試料溶液を無菌バイアルビンに0.5mLずつ分注した以外は同様の方法で、表1記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た(それぞれ実施例35-1、実施例35-2、実施例35-3、実施例35-4)。

【0083】

【実施例36】

実施例26で無菌ろ過した試料溶液を無菌バイアルビンに0.333mLずつ分注した以外は同様の方法で、表1記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た(それぞれ実施例36-1、実施例36-2、実施例36-3、実施例36-4)。

【0084】

【実施例37】

添加剤溶液調製

20mLのメスフラスコにL-グルタミン酸ナトリウム一水和物(和光純薬) 2.5mmolおよびD(-)-マンニトール(和光純薬) 2.5mmolを量り入れ、注射用水を加え溶解して20mLとした。

試料溶液調製

上記添加剤溶液4mLを15mLのアシストチューブに入れ、参考例1で得られたTMD 123Hを5mL(可溶性トロンボモジュリンとして300mg含有する)および50mM NaClを含む20mMリン酸塩緩衝液(pH7.3)を1mL加え、混合攪拌した。この試料溶液をデイスポシリンジ25mL(テルモ製)を用い、孔径:0.22 $\mu$ m(ミリポア製MILLEX-GV)のフィルターを付けてろ過滅菌し、無菌バイアルビン(不二硝子製3010)に1mLずつ分注した。

凍結乾燥

ゴム栓半打栓→凍結乾燥→窒素充填→ゴム栓打栓→キャップ巻締め of 順で以下の条件にて凍結乾燥工程を行い、可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（実施例37-1）。

【0085】

〔凍結乾燥条件〕

予備冷却（15分かけて室温から15℃）→ 本冷却（2時間かけて15℃から-45℃）→ 保持（2時間 -45℃）→ 真空開始（18時間 -45℃）→ 昇温（20時間かけて-45℃から25℃）→ 保持（15時間25℃）→ 昇温（1時間かけて25℃から45℃）→ 保持（5時間45℃）→ 室温（2時間かけて45℃から25℃）→ 復圧窒素充填（-100mmHgまで）→ 打栓 → キャップ巻締め

同様に、参考例1で得られたTMD123Hの代わりにTMD123HM（実施例37-2）、TME456H（実施例37-3）、およびTME456HM（実施例37-4）を用いて、それぞれ上記の方法にしたがって可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た。

【0086】

【実施例38】

L-グルタミン酸ナトリウム一水和物の代わりに、L-アスパラギン酸ナトリウム一水和物（和光純薬）を量り入れる以外は実施例37と同様の方法で、可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（それぞれ実施例38-1、実施例38-2、実施例38-3、実施例38-4）。

【0087】

【比較例1】

20mLのメスフラスコにL-アルギニン一塩酸塩（和光純薬）20mmolおよびスクロース（和光純薬）20mmolを量り入れ、注射用水を加え溶解して20mLとした。ここから7.5mLを15mLのアシストチューブに入れ、参考例1で得られた TMD123Hを2.5mL（可溶性トロンボモジュリンとして150mg 含有する）加え、混合攪拌した。この試料溶液をディスポシリンジ25mL（テルモ製）を用い、孔径：0.22μm（ミリポア製MILLEX-GV）のフィルターを付けてろ過滅菌し、無菌バイアルビン（不二硝子製3010）に1mLずつ分注した。



【 0 0 8 8 】

凍結乾燥

ゴム栓半打栓→凍結乾燥→窒素充填→ゴム栓打栓→キャップ巻締めの順で実施例 1 記載の条件にて凍結乾燥工程を行い、1 容器中に可溶性トロンボモジュリン 15mg、L-アルギニン塩酸塩 0.75mmol、スクロース 0.75mmol を含む組成物を得た。

【 0 0 8 9 】

## 【比較例 2】

20mL のメスフラスコに L-アルギニン塩酸塩（和光純薬）20mmol およびスクロース（和光純薬）20mmol を量り入れ、注射用水を加え溶解して 20mL とした。ここから 5mL を 15mL のアシストチューブに入れ、参考例 1 で得られた TMD123H を 1.67mL（可溶性トロンボモジュリンとして 100mg 含有する）および注射用水 3.33mL 加え、混合攪拌した以外は比較例 1 と同様の方法で、表 1 記載の組成物を得た。

【 0 0 9 0 】

## 【比較例 3】

15mL のアシストチューブに、参考例 1 で得られた TMD123H を 5mL（可溶性トロンボモジュリンとして 300mg 含有する）および注射用水 5mL 加え、混合攪拌した以外は比較例 1 と同様の方法で、表 1 記載の組成物を得た。

【 0 0 9 1 】

## 【比較例 4】

実施例 1 の添加剤溶液調製で、表 1 記載の添加剤を 1.25mmol 量り入れる以外は同様の方法で、表 1 記載の組成物を得た。

【 0 0 9 2 】

## 【比較例 5】

実施例 1 の添加剤溶液調製で、表 1 記載の添加剤を 1.25mmol 量り入れる以外は同様の方法で、表 1 記載の組成物を得た。

【 0 0 9 3 】

## 【比較例 6】

実施例 1 の添加剤溶液調製で、表 1 記載の添加剤を 2.5mmol 量り入れる以外は

同様の方法で、表1記載の組成物を得た。

【0094】

【比較例7】

実施例1の添加剤溶液調製で、表1記載の添加剤を2.5mmol量り入れる以外は同様の方法で、表1記載の組成物を得た。

【0095】

【比較例8】

実施例1の添加剤溶液調製で、表1記載の添加剤を3.75mmol量り入れる以外は同様の方法で、表1記載の組成物を得た。

【0096】

【比較例9】

実施例1の添加剤溶液調製で、表1記載の添加剤を3.75mmol量り入れる以外は同様の方法で、表1記載の組成物を得た。

【0097】

【比較例10】

実施例1の添加剤溶液調製で、表1記載の添加剤を1.25mmol量り入れる以外は同様の方法で、表1記載の組成物を得た。

【0098】

【比較例11】

実施例1の添加剤溶液調製で、表1記載の添加剤を2.5mmol量り入れる以外は同様の方法で、表1記載の組成物を得た。

【0099】

【比較例12】

実施例1の添加剤溶液調製で、表1記載の添加剤を3.75mmol量り入れる以外は同様の方法で、表1記載の組成物を得た。

【0100】

【投与例1】

実施例1-1で得た可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を、注射用水（大塚製薬株式会社）0.75mLを加えて再溶解し、投与用組成物を得た。

【投与例 2】

実施例1-2で得た可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を、注射用水（大塚製薬株式会社）0.75mLを加えて再溶解し、投与用組成物を得た。

【投与例 3】

実施例1-3で得た可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を、注射用水（大塚製薬株式会社）0.75mLを加えて再溶解し、投与用組成物を得た。

【投与例 4】

実施例1-4で得た可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を、注射用水（大塚製薬株式会社）0.75mLを加えて再溶解し、投与用組成物を得た。

【投与例 5】

実施例2-1で得た可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を、注射用水（大塚製薬株式会社）1.0mL を加えて再溶解し、投与用組成物を得た。

【投与例 6】

実施例1-1で得た可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を、注射用水（大塚製薬株式会社）1.5mLを加えて再溶解し、投与用組成物を得た。

【投与例 7】

実施例1-1で得た可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を、注射用水（大塚製薬株式会社）0.5mLを加えて再溶解し、投与用組成物を得た。

【0 1 0 1】

【比較投与例 1】

生理食塩液（大塚製薬株式会社）を投与用組成物とした。

【比較投与例 2】

塩化ナトリウム（和光純薬）9.00gを注射用水（大塚製薬株式会社）に溶解して100mLとし、投与用組成物を得た。

【比較投与例 3】

比較例 1 で得た組成物を、注射用水（大塚製薬株式会社）1.0mLを加えて再溶解し、投与用組成物を得た。

【比較投与例 4】

比較例 2 で得た組成物を、注射用水（大塚製薬株式会社）2.0mLを加えて再溶

解し、投与用組成物を得た。

#### 【比較投与例 5】

比較例 3 で得た組成物を、注射用水（大塚製薬株式会社）1.0mLを加えて再溶解し、投与用組成物を得た。

#### 【0102】

#### 【実験例 1】

#### 疼痛試験

表 2 に示された投与例又は比較投与例の投与溶液の疼痛の程度をQuartaroli M らの方法（J. Pharmacol. Exp. Ther., 290(1):158-69, 1999）に準じて評価した。CDマウス（25-30g、チャールスリバー）を一晩絶食させ12群に分けた後、透明個別ケージに15分入れて馴化させた。各投与例および比較投与例の投与溶液を左後肢に20  $\mu$ L 皮下投与した。投与後直ちに個別ケージに戻し、5分間に左後肢の持ち上げ時間および投与部位をなめる時間をトータルでカウントし疼痛の指標とした。実験は1匹ずつ行い、1群  $n = 6$  匹で平均時間を求めた。結果を表 2 に示す。

#### 【0103】

#### 【実験例 2】

実験例 1 で用いた各投与溶液の浸透圧比を求めた。

#### 浸透圧比の求め方

浸透圧比は、生理食塩液の与えるオスモル濃度に対する試料溶液のオスモル濃度の比と定義（第14改正日本薬局方、浸透圧測定法）され、生理食塩液（0.900g/100mL）のオスモル濃度は一定（286mOsm）であることから次式で計算した〔浸透圧比＝試料溶液のオスモル濃度（mOsm）/286（mOsm）〕。

なお、オスモル濃度は、第14改正日本薬局方の浸透圧測定法にしたがって求めた。すなわち、浸透圧測定装置（VOGEL社製 OM802-D）を用いて、以下の方法に従ってあらかじめ二点校正法により装置の校正を行い、装置の適合性を確認したのちに試料溶液のオスモル濃度を測定した。

#### 【0104】

#### 装置の校正法

注射用水（大塚製薬製）でゼロ補正を行い、次に装置校正用オスモル濃度標準液200mOsm および400mOsm で装置の校正を行った。

〔装置校正用オスモル濃度標準液200mOsm の調製〕

塩化ナトリウム（和光純薬）を 600℃で50分間乾燥し、デシケーター（シリカゲル）中で放冷する。この塩化ナトリウム0.626gを正確に量り、注射用水100gを加えて溶かした。

〔装置用オスモル濃度標準液400mOsm の調製〕

塩化ナトリウム（和光純薬）を 600℃で50分間乾燥し、デシケーター（シリカゲル）中で放冷する。この塩化ナトリウム1.270gを正確に量り、注射用水100gを加えて溶かした。

【0105】

装置の適合性

300mOsm 標準液（VOGEL社製）を 6 回繰り返し測定を行って、6 回の相対標準偏差が 2 %以内であり、測定値が 291～309mOsm であることを確認した。

【0106】

試料溶液の測定

各投与溶液を専用サンプルカップ（VOGEL社製）に採取し測定を行った。なお、比較投与例2,3,4 で得られた投与溶液は注射用水（大塚製薬製）でそれぞれ10,10,3 倍に希釈して、この液につき同様な測定を行い、得られたオスモル濃度を10,10,3倍した。表 2 にその結果を示した。

表 2 から明らかなように、投与例 1 から 7 の各投与溶液は、マウスにおいて疼痛時間は非常に短く、比較投与例 1 の生理食塩液とほぼ同等であり、疼痛の程度は大きいものではないことがわかった。比較投与例 2 から 4 の投与溶液は、疼痛時間が長いものであり、従って疼痛の程度が大きく好ましくないことが確認された。実験例 2 の浸透圧比を調べてみたところ表 2 で示したとおり疼痛時間の短い組成物は浸透圧比が 1 付近にあり、顕著に疼痛時間が長い組成物は浸透圧比が高いまたは低いものであった。

表 2 から明らかなように、実施例で得られた可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を0.1mL から2mL の水に溶解したときの浸透圧比がほぼ 1 となり、該製

剤は例えば筋肉内投与や皮下投与方法の投与方法に採用できることが明確となった。

【0107】

【表2】

投与例	投与溶液		疼痛時間（秒）	浸透圧比
	組成物	再溶解液量(ml)		
投与例1	実施例1-1	0.75	15	1.1
投与例2	実施例1-2	0.75	14	1.1
投与例3	実施例1-3	0.75	16	1.1
投与例4	実施例1-4	0.75	17	1.1
投与例5	実施例2-1	1.0	15	1.0
投与例6	実施例1-1	1.5	19	0.6
投与例7	実施例1-1	0.5	20	1.6
比較投与例1	生理食塩液	-	12	1.0
比較投与例2	9%食塩水	-	125	10.0
比較投与例3	比較例1	1.0	127	10.1
比較投与例4	比較例2	2.0	81	3.4
比較投与例5	比較例3	1.0	45	0.2

【0108】

【実験例3】

以下に、実施例で得られた可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤および比較例で得た組成物を60℃の恒温器に保存し、2週間目に該製剤を再溶解し、その投与用薬剤の会合体生成率(%)を測定した。

【0109】

会合体生成率の測定法

可溶性トロンボモジュリンの会合体生成率をHPLC分析ゲルろ過法により測定した。つまり、移動相は0.1mmol/L 硫酸ナトリウムを含む50mmol/Lリン酸塩緩衝液 pH7.3に調製したものを、カラムはTSK-gel 3000SWXL（東ソー株式会社）を用い、カラム温度は25℃付近の一定温度で行った。流量は、可溶性トロンボモジュリンの保持時間が9分となるように調整した。サンプル溶液は、可溶性トロンボモジュリンの含有量が1mg/mLとなるように0.1mmol/L 硫酸ナトリウムを含む50mmol/Lリン酸塩緩衝液の移動相を加えて希釈し調製した。この液0.15mLを注入した。紫外可視吸光度計（測定波長：280nm）で可溶性トロンボモジュリンのピーク面積(A) および約7から8分に現れる会合体のピーク面積(B) を求め、 $100 \times B/(A+B)$  より会合体生成率(%)を算出した。表3にその結果を示した。

表3から明らかなように、添加剤を加えない場合（比較例3）には会合体の生成率は高く、比較例4から11のように単独で添加する場合に比べて、実施例のように2種の添加剤を組合せることにより、極めて高い安定性が達成されという顕著な相乗効果が認められた。また、実施例19から38で得られた可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤、および実施例1から18で得られたTME456H またはTME456HMを含有する可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤についても表3と同様に会合体の生成率を抑える結果が得られた。

従って、本発明の実施例は会合体の生成率が低く、かつ投与するために溶解した場合に疼痛が少ないものであることが確認された。

【0110】

【表 3】

	添 加 剤	添加量 (mmol)	会合体生成率 (%)	
			用いた可溶性トロンボ モジュリンの種類 添加量 30mg	
			TMD123H	TMD123HM
実施例1	L-グルタミン酸Na-水和物 D(-)-マンニトール	0.05		
		0.05	0.32	0.4
実施例2	L-グルタミン酸Na-水和物 D(-)-マンニトール	0.075		
		0.075	0.34	0.36
実施例3	L-グルタミン酸Na-水和物 D(-)-マンニトール	0.025		
		0.025	0.52	0.53
実施例4	L-グルタミン酸Na-水和物 D(-)-マンニトール	0.02		
		0.10	0.36	0.41
実施例5	L-グルタミン酸Na-水和物 D(-)-マンニトール	0.07		
		0.02	0.37	0.33
実施例6	L-グルタミン酸Na-水和物 D(-)-マンニトール	0.03		
		0.15	0.39	0.37



【表3のつづき】

実施例7	L-グルタミン酸Na-水和物	0.10	0.43	0.39
	D(-)-マンニトール	0.03		
実施例8	L-グルタミン酸Na-水和物	0.05	0.40	0.43
	L-リシン塩酸塩	0.05		
実施例9	L-グルタミン酸Na-水和物	0.03	0.32	0.35
	L-リシン塩酸塩	0.07		
実施例10	L-リシン L-グルタミン酸塩二水和物		0.39	0.36
	リシン	0.10		
	グルタミン酸	0.10		
実施例11	L-リシン L-グルタミン酸塩二水和物		0.42	0.45
	リシン	0.15		
	グルタミン酸	0.15		
実施例12	L-グルタミン酸Na-水和物	0.06	0.55	0.5
	L-アスパラギン酸Na-水和物	0.06		
実施例13	L-アスパラギン酸Na-水和物	0.05	0.41	0.44
	D(-)-マンニトール	0.05		
実施例14	尿素	0.07	0.59	0.56
実施例15	尿素	0.05	0.42	0.45
	L-グルタミン酸Na-水和物	0.05		

【表 3 の つづき】

実施例16	尿素	0.05		
	L-アスパラギン酸Na-水和物	0.05	0.53	0.55
実施例17	L-グルタミン酸Na-水和物	0.05		
	D(-)- マンニトール	0.05	0.34	0.38
実施例18	アスパラギン酸Na-水和物	0.05		
	D(-)- マンニトール	0.05	0.39	0.42
比較例 3	添加剤なし	0	3.21	3.51
比較例 4	L-グルタミン酸Na-水和物	0.025	1.56	1.59
比較例 5	D(-)- マンニトール	0.025	1.89	1.97
比較例 6	L-グルタミン酸Na-水和物	0.05	0.80	0.87
比較例 7	D(-)- マンニトール	0.05	0.91	1.16
比較例 8	L-グルタミン酸Na-水和物	0.075	0.73	0.77
比較例 9	D(-)- マンニトール	0.075	0.83	0.92
比較例11	L-アスパラギン酸Na-水和物	0.05	0.98	1.05

【0111】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 旭化成株式会社 Asahi Kasei Kabushi Kaisha

<120> 可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤

Soluble Thrombomodulin high concentrated pharmaceuticals

<130> X 1 3 - 1 5 6 8

<210> 1

<211> 516

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒト可溶性トロンボモジュリンの部分的なアミノ酸配列

<400> 1

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Gly

1 5 10 15

Phe Pro Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln Cys Val Glu

20 25 30

His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala

35 40 45

Ser Gln Ile Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val Arg Ser

50 55 60

Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly

65 70 75 80

Val Gly Arg Arg Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly Cys

85 90 95

Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg Gly Phe Gln Trp Val Thr

100 105 110

Gly Asp Asn Asn Thr Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn

115	120	125
Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala Val Ser Ala Ala Glu		
130	135	140
Ala Thr Val Pro Ser Glu Pro Ile Trp Glu Glu Gln Gln Cys Glu Val		
145	150	155
Lys Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro Ala Thr Cys Arg		
165	170	175
Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr		
180	185	190
Tyr Gly Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln Ala Leu Pro		
195	200	205
Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys		
210	215	220
Thr Ala Pro Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Glu Ala Pro		
225	230	235
Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala Cys		
245	250	255
Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala Ala		
260	265	270
Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys		
275	280	285
Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly		
290	295	300
Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln		
305	310	315
His Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys		
325	330	335
Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr		
340	345	350

Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys Val Glu Pro Val Asp Pro  
 355 360 365  
 Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr  
 370 375 380  
 Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro Ile Pro His Glu  
 385 390 395 400  
 Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp  
 405 410 415  
 Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile  
 420 425 430  
 Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly  
 435 440 445  
 Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys  
 450 455 460  
 Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Val Arg His Ile Gly Thr Asp Cys  
 465 470 475 480  
 Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly Ser Gly Glu Pro Pro  
 485 490 495  
 Pro Ser Pro Thr Pro Gly Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu  
 500 505 510  
 Val His Ser Gly  
 515

【 0 1 1 2 】

<210> 2

<211> 1548

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

## &lt;223&gt; ヒト可溶性トロンボモジュリン遺伝子の部分的な塩基配列

&lt;400&gt; 2

```

atgcttgggg tcctggtcct tggcgcgctg gccctggccg gcctgggggt cccgcacccc 60
gcagagccgc agccgggtgg cagccagtgc gtcgagcacg actgcttcgc gctctacccg 120
ggccccgcga ccttcctcaa tgccagtcag atctgcgacg gactgcgggg ccacctaata 180
acagtgcgct cctcgggtggc tgccgatgtc atttccttgc tactgaacgg cgacggcggc 240
gttgcccgcc ggcgccctctg gatcggcctg cagctgccac ccggctgcgg cgaccccaag 300
cgcctcgggc ccctgcgcgg cttccagtgg gttacgggag acaacaacac cagctatagc 360
aggtgggcac ggctcgacct caatggggct cccctctgcg gcccgttgtg cgtcgtctgc 420
tccgctgctg aggccactgt gccagcgag ccgatctggg aggagcagca gtgcgaagtg 480
aaggccgatg gcttcctctg cgagttccac ttcccagcca cctgcaggcc actggctgtg 540
gagccccggc ccgcggctgc cgccgtctcg atcacctacg gcaccccggt cgcgggccgc 600
ggagcggact tccaggcgct gccggtgggc agctccgccg cggtggctcc cctcggctta 660
cagctaatagt gcaccgcgcc gcccgagcgc gtccaggggc actgggcccag ggaggcgcgc 720
ggcgcttggg actgcagcgt ggagaacggc ggctgcgagc acgcgtgcaa tgcgatccct 780
ggggctcccc gctgccagtg cccagccggc gccgccctgc aggcagacgg gcgctcctgc 840
accgcatccg cgacgcagtc ctgcaacgac ctctgcgagc acttctgcgt tcccaacccc 900
gaccagccgg gctcctactc gtgcatgtgc gagaccggct accggctggc ggccgaccaa 960
caccggtgcg aggacgtgga tgactgcata ctggagccca gtccgtgtcc gcagcgtgtg 1020
gtcaacacac aggggtggctt cgagtgccac tgctacccta actacgacct ggtggacggc 1080
gagtgtgtgg agcccgtgga cccgtgcttc agagccaact gcgagtacca gtgccagccc 1140
ctgaacaaa ctagctacct ctgcgtctgc gccgagggct tcgcgcccac tccccacgag 1200
ccgcacaggt gccagatgtt ttgcaaccag actgcctgtc cagccgactg cgaccccaac 1260
accaggcta gctgtgagtg ccctgaaggc tacatcctgg acgacggttt catctgcacg 1320
gacatcgacg agtgcgaaaa cggcggcttc tgctccgggg tgtgccacaa cctccccggg 1380
accttcgagt gcatctgcgg gcccgactcg gcccttgtcc gccacattgg caccgac. t 1440
gactccggca aggtggacgg tggcgacagc ggctctggcg agccccgcc cagcccgcag 1500
cccggtcca ccttgactcc tccggccgtg gggctcgtgc attcgggc 1548

```

## 【0113】

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 132

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ヒト可溶性トロンボモジュリンの部分的なアミノ酸配列

&lt;400&gt; 8

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Gly

1 5 10 15

Phe Pro Asp Pro Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro

20 25 30

Leu Asn Gln Thr Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro

35 40 45

Ile Pro His Glu Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala

50 55 60

Cys Pro Ala Asp Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro

65 70 75 80

Glu Gly Tyr Ile Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu

85 90 95

Cys Glu Asn Gly Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly

100 105 110

Thr Phe Glu Cys Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Val Arg His Ile

115 120 125

Gly Thr Asp Cys

130

## 【0114】

&lt;210&gt; 4

<211> 396

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒト可溶性トロンボモジュリン遺伝子の部分的な塩基配列

<400> 4

```

atgcttgggg tcctggtcct tggcgcgctg gccctggccg gcctgggggtt ccccgaccgc 60
tgcttcagag ccaactgcga gtaccagtgc cagcccctga accaaactag ctacctctgc 120
gtctgcgccg aggggttcgc gccattccc cagagccgc acaggtgcca gatgttttgc 180
aaccagactg cctgtccagc cgactgcgac cccaacaccc aggctagctg tgagtgcctt 240
gaaggctaca tcctggacga cggtttcatc tgcacggaca tcgacgagtg cgaaaacggc 300
ggcttctgct ccgggggtgtg ccacaacctc cccggtacct tcgagtgcac ctgcggggccc 360
gactcggccc ttgtccgcca cattggcacc gactgt                                     396

```

【 0 1 1 5 】

<210> 5

<211> 516

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒト可溶性トロンボモジュリンの部分的なアミノ酸配列

<400> 5

```

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Gly
 1             5             10             15
Phe Pro Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln Cys Val Glu
          20             25             30
His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala

```



35	40	45
Ser Gln Ile Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val Arg Ser		
50	55	60
Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly		
65	70	75
Val Gly Arg Arg Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly Cys		
85	90	95
Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg Gly Phe Gln Trp Val Thr		
100	105	110
Gly Asp Asn Asn Thr Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn		
115	120	125
Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala Val Ser Ala Ala Glu		
130	135	140
Ala Thr Val Pro Ser Glu Pro Ile Trp Glu Glu Gln Gln Cys Glu Val		
145	150	155
Lys Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro Ala Thr Cys Arg		
165	170	175
Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr		
180	185	190
Tyr Gly Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln Ala Leu Pro		
195	200	205
Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys		
210	215	220
Thr Ala Pro Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Glu Ala Pro		
225	230	235
Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala Cys		
245	250	255
Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala Ala		
260	265	270

Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys  
 275 280 285  
 Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly  
 290 295 300  
 Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln  
 305 310 315 320  
 His Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys  
 325 330 335  
 Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr  
 340 345 350  
 Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys Val Glu Pro Val Asp Pro  
 355 360 365  
 Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr  
 370 375 380  
 Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro Ile Pro His Glu  
 385 390 395 400  
 Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp  
 405 410 415  
 Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile  
 420 425 430  
 Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly  
 435 440 445  
 Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys  
 450 455 460  
 Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Ala Arg His Ile Gly Thr Asp Cys  
 465 470 475 480  
 Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly Ser Gly Glu Pro Pro  
 485 490 495  
 Pro Ser Pro Thr Pro Gly Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu

500

505

510

Val His Ser Gly

515

【 0 1 1 6 】

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 1548

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ヒト可溶性トロンボモジュリン遺伝子の部分的な塩基配列

&lt;400&gt; 6

atgcttgggg tcctggtcct tggcgcgctg gccctggccg gcctgggggt ccccgcaccc 60  
 gcagagccgc agccgggtgg cagccagtgc gtcgagcacg actgcttcgc gctctacccg 120  
 ggccccgcga ctttcctcaa tgccagtcag atctgcgacg gactgcgggg ccacctaattg 180  
 acagtgcgct cctcggtggc tgccgatgtc atttccttgc tactgaacgg cgacggcggc 240  
 gttggccgcc ggcgccctctg gatcggcctg cagctgccac ccggctgcgg cgaccccaag 300  
 cgcctcgggc ccctgcgcgg cttccagtgg gttacgggag acaacaacac cagctatagc 360  
 aggtgggcac ggctcgacct caatggggct cccctctgcg gcccgttgtg cgtcgctgtc 420  
 tccgctgctg aggccactgt gccagcgag ccgatctggg aggagcagca gtgcgaagtg 480  
 aaggccgatg gcttcctctg cgagttccac ttccagcca cctgcaggcc actggctgtg 540  
 gagccccgcg ccgcggctgc cgccgtctcg atcacctacg gcaccccggt cgcgggccgc 600  
 ggagcggact tccaggcgct gccggtgggc agctccgccg cgggtggctcc cctcggtcta 660  
 cagctaattg gcaccgcgcc gcccgagcg gtccaggggc actgggcccag ggaggcgccg 720  
 ggcgcttggg actgcagcgt ggagaacggc ggctgcgagc acgcgtgcaa tgcgatccct 780  
 ggggctcccc gctgccagtg ccagccggc gccgccctgc aggcagacgg gcgctcctgc 840  
 accgcattccg cgacgcagtc ctgcaacgac ctctgcgagc acttctgcgt tccaaccccc 900  
 gaccagccgg gctcctactc gtgcatgtgc gagaccggt accggctggc ggccgaccaa 960

caccggtgcg aggacgtgga tgactgcata ctggagccca gtccgtgtcc gcagcgctgt 1020  
 gtcaacacac aggggtggctt cgagtgccac tgctacccta actacgacct ggtggacggc 1080  
 gagtgtgtgg agcccgtgga cccgtgcttc agagccaact gcgagtacca gtgccagccc 1140  
 ctgaacaaaa ctagctacct ctgcgtctgc gccgagggtc tcgcgcccac tccccacgag 1200  
 ccgcacaggt gccagatggt ttgcaaccag actgcctgtc cagccgactg cgaccccaac 1260  
 acccaggcta gctgtgagtg ccctgaaggc tacatcctgg acgacggttt catctgcacg 1320  
 gacatcgacg agtgcgaaaa cggcggcttc tgctccgggg tgtgccacaa cctccccggt 1380  
 accttcgagt gcatctgcgg gcccgactcg gcccttgccc gccacattgg caccgactgt 1440  
 gactccggca aggtggacgg tggcgacagc ggctctggcg agcccccgcc cagcccgacg 1500  
 cccggctcca ccttgactcc tccggccgtg gggctcgtgc attcgggc 1548

【0 1 1 7】

<210> 7

<211> 132

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒト可溶性トロンプモジュリンの部分的なアミノ酸配列

<400> 7

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Gly

1 5 10 15

Phe Pro Asp Pro Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro

20 25 30

Leu Asn Gln Thr Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro

35 40 45

Ile Pro His Glu Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala

50 55 60

Cys Pro Ala Asp Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro

65 70 75 80

Glu Gly Tyr Ile Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu

85

90

95

Cys Glu Asn Gly Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly

100

105

110

Thr Phe Glu Cys Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Ala Arg His Ile

115

120

125

Gly Thr Asp Cys

130

【0118】

<210> 8

<211> 396

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒト可溶性トロンプモジュリン遺伝子の部分的な塩基配列

<400> 8

atgcttgggg tcctggtcct tggcgcgctg gccctggccg gcctgggggt ccccgacccg 60  
tgcttcagag ccaactgcga gtaccagtgc cagcccctga accaaactag ctacctctgc 120  
gtctgcgccg agggcttcgc gccattccc cagagccgc acaggtgcca gatgttttgc 180  
aaccagactg cctgtccagc cgactgcgac cccaacaccc aggctagctg tgagtgcct 240  
gaaggctaca tcctggacga cggtttcac tgcacggaca tcgacgagtgc gaaaacggc 300  
ggcttctgct ccggggtgtg ccacaacctc cccggtacct tcgagtgcac ctgcggggccc 360  
gactcggccc ttgcccgcga cattggcacc gactgt 396

【0119】

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 変異用の合成DNA

<400> 9

aatgtggcgg gcaagggccg a

21

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 安定性の高い可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤の提供。

【解決手段】 可溶性トロンボモジュリンと、グルタミン酸とマンニトール、リジンまたはアスパラギン酸とを、あるいはアスパラギン酸とマンニトールとを組み合わせて含有させた可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤。

グルタミン酸、アスパラギン酸にかえてその塩を用いることができる。

該製剤は、有効成分の可溶性トロンボモジュリン10mg以上を0.1 mL～2 mLの水に溶解することができ、浸透圧が0.5 ～2.0 となり、投与時の疼痛を緩和し、会合体の生成を防止することができる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-009951
受付番号	50200061115
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 1月21日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 1月18日
-------	-------------



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000033]

1. 変更年月日	2001年 1月 4日
[変更理由]	名称変更
住 所	大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
氏 名	旭化成株式会社